

전통 발효식초에서 분리한 *Lactobacillus harbinensis* VF의 프로바이오틱스 활성

정지안¹ · 유지영¹ · 이성실² · 최준호^{1,3*}

¹원광대학교 식품생명공학과, ²원광대학교 일반대학원 경영학과, ³원광식품산업연구원

Potential Probiotic Activity of Isolated *Lactobacillus harbinensis* VF from Traditionally Fermented Vinegar

Ji An Jung¹, Ji-Young You¹, Sung Sil Lee², and Joon Ho Choi^{1,3*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Wonkwang University

²Department of Business Administration, Wonkwang University

³Wonkwang Research Institute for food Industry, Wonkwang University

Abstract

A novel *L. harbinensis* VF was isolated from fermented vinegar and identified through biochemical characteristics and 16S rRNA sequencing analysis. Characteristics of probiotics were studied for acid and bile salt tolerances, hemolytic activity, antibiotic resistance, antimicrobial activity, cell surface hydrophobicity, and aggregation. The survival rates of the isolate were maintained at 68.9% and 95.6% after 3 h incubation at pH 2.0 and 2.5 and were over 74% at bile salt concentrations of 0.3% and 0.5%. The hemolytic activity was confirmed to be γ -hemolysis. The isolate showed broad antibiotics-resistance in over 12 antibiotics except for trimethoprim/sulfamethoxazole, compared to *L. plantarum* (KCTC 3108), used as control, and previously reported *L. harbinensis*. Antimicrobial activity was confirmed against pathogens, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, and *S. typhimurium*, except *S. aureus*, and it was attributed to produced organic acids (low pH). The hydrophobicity for xylene and chloroform were 16.7% and 20.4%, respectively, lower than those of *L. plantarum* (41.2% & 49.9%). The auto-aggregation and co-aggregation with pathogens were 83.8% and 49.2-87.6% at 24 h incubation, respectively, higher than those of *L. plantarum*. From this study, *L. harbinensis* VF is likely to be used as a probiotic strain and is a strong candidate for commercial application.

Keywords: *L. harbinensis* VF, lactobacillus, probiotics, vinegar

서 론

유산균(Lactic acid bacteria, LAB)은 대표적인 프로바이오틱스(Probiotics)로 포도당 등의 당류를 이용해 유기산, 저급지방산, 박테리오킨과 같은 항균물질 등 다양한 대사 물질을 생산하여 식품의 부패를 억제하고 장내 균총 안정화 및 정장 작용, 면역활성화, 고혈압 및 고지혈증 개선, 항암효과 등 다양한 기능성으로 인하여 건강과 웰빙에 도움을 주는 것으로 알려져 있다(Fijan, 2014; Reid et al., 2003). 유산균은 전통적인 식품산업(유제품, 육류 및 야채, 음료)에서 광범위하게 응용되고 있으며 프로바이오틱스 기능을 지닌 유산균에 대한 연구도 지속적으로 진행되어왔다.

하지만 일부 유산균인 *L. perolens*는 16S rRNA 염기서열 분석방법을 이용하여 청량음료나 맥아즙에서 부패 미생물로 확인되기도 하였다(Back et al., 1999).

*L. harbinensis*는 중국 동북부 하얼빈의 전통 채소발효식품인 “Suan cai”에서 2005년에 처음 보고된 이후(Miyamoto et al., 2005) 우리나라 탁주인 막걸리(Jin et al., 2008), 발효식품에서 변화하는 미생물 군락(Lacerda et al., 2011; Sagdic et al., 2014; Sekwati-Monang et al., 2012), 항곰팡이 기능을 부여하는 발효유(Delavenne et al., 2013; Delavenne et al., 2015), 토마토 사일리지(Wu et al., 2014a, 2014b), Kefir 발효식품(Angelescu et al., 2019; Laureys & Vuyst, 2014; Talib et al., 2019), 발효유 제품(Colombo et al., 2018), 두유를 이용한 발효식품(Zheng et al., 2020) 등에서 제한적으로 보고되어 왔다.

일반적으로 유산균은 장내의 낮은 pH 및 담즙산에 대한 내성을 지니며 안정성이 확보된 GRAS (generally regarded as safe)로 분류되어 프로바이오틱스로서 이용가치가 매우

*Corresponding author: Joon Ho Choi, Department of Food Science and Biotechnology, Wonkwang University, Iksan 54538, Korea
Tel: +82-63-850-6679; Fax: +82-63-850-6656
E-mail: jhchoi1124@wku.ac.kr

Received April 4, 2023; revised April 4, 2023; accepted May 23, 2023

높은 것으로 알려져 있다(Hill et al., 2014). 그러나 특정 유산균을 프로바이오틱스로 이용하기 위해서는 섭취에 대한 안전성, 소화기관 내에서의 안정성, 세포 정착능력과 항균활성에 대한 기능성과 배양에 대한 기술적인 부분에 대한 검증이 이루어져야 된다(Fijan, 2014). 대부분 산업적으로 이용되고 있는 프로바이오틱스는 인체 유래 또는 유제품 등에서 분리한 동물 유래 유산균이 대부분이었으나 최근에는 김치를 포함하여 전통 발효식품(Kim et al., 2019; Kim et al., 2016; Seo et al., 2020)에서 분리된 식물 유래 유산균에서도 프로바이오틱스 기능이 있다고 밝혀지고 있지만 아직까지 상업적인 활용은 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 전통 발효식품인 식초로부터 순수 분리한 유산균인 *L. harbinensis*에 대하여 16S rRNA 염기서열 분석과 생화학적 특성을 규명하고, 용혈성, 내산성 및 내담즙성, 항생제에 대한 내성, 항균 활성, 장내 상피세포 부착능 등 안정성과 기능성을 지닌 프로바이오틱스 소재로서 적용 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

유산균 분리 및 배양

전북 김제에 소재한 자람농원에서 청일뽕(*Morus alba* L.)을 이용하여 제조한 전통 발효식초에서 산 생성력이 높은 균주를 분리하였다. 전통 발효식초를 멸균 생리식염수를 이용한 희석액을 3% CaCO₃과 2% (v/v) 에탄올을 함유한 초산균 분리용 GY (glucose-yeast extract) 평판배지 (5% Glucose; 1% Yeast extract)에 도말하여 25°C에서 5일간 배양한 후 colony 주변에 투명환이 확인된 균주를 1차 선별하였다. 선별한 균주를 GY 평판배지에서 희선평판법으로 계대 배양하여 단일 균주를 확보하였다. 확보한 균주를 MRS (De Man, Rogosa and Sharpe agar) (BD Difco™, NJ, USA) 평판배지에 희선평판법으로 접종한 이후 37°C에서 24시간 배양하여 유산균을 확보하였다. 확보한 유산균은 MRS 액체배지를 이용하여 37°C에서 16시간 배양한 이후 원심분리(Combi-514R, Hanil Scientific Inc., Gyeonggi-do, Korea)하여 농축시킨 균액을 20% glycerol과 1:1 비율로 혼합한 후 -80°C에서 보관하였다. 분리한 유산균주와 비교를 위하여 대표적인 식물 유래 유산균으로 알려진 *L. plantarum* (KCTC 3108) (LP)은 생물자원센터로부터 분양받아 사용하였다.

생리학적 및 생화학적 특성

분리한 유산균은 Gram 염색 후 광학현미경(BX60, Olympus, Japan)을 이용하여 형태학적 특성을 확인하였으며 49종의 탄수화물(당) 이용능은 제조사 방법에 따라 API® 50 CH test kit (bioMérieux, France)를 이용하여 조사하였다.

16S rRNA 염기서열 분석

분리한 유산균의 16S rRNA 염기서열을 솔젠트(주)(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 분석하였다. Genomic DNA extraction kit (iNtRON Biotech., Korea)를 이용하여 DNA를 추출하고 universal primer인 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', forward), 1492R (5'-GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3', reverse)를 사용하여 Solg™ EF-Taq DNA Polymerase (Solgent Co., Ltd. Deajeon, Korea)를 이용하여 PCR (polymerase chain reaction)을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 1분간 열 변성 후, 45°C에서 1분간 primer 결합, 72°C에서 1분 30초간 DNA 신장으로 30회 반복 반응을 실시하였다. 증폭된 DNA는 전기영동 후 확인된 DNA를 QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다. 16S rRNA 염기서열은 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits와 ABI Prism 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA)를 사용하여 결정하였고 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)자료와 비교하여 동정하였다.

내산성, 내담즙성 및 용혈성 측정

장내환경과 유사한 산성 및 담즙산에 대한 생존율을 확인하기 위해 분리된 유산균을 MRS 액체배지를 이용하여 37°C에서 24시간 배양한 후 15분간 4,000 rpm으로 원심분리하여 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.0) 용액에 현탁하여 10⁹ CFU/mL이 되도록 준비하였다. 내산성과 내담즙성은 각각 pH를 2.0, 2.5, 3.0, 5.0, 6.0으로 조정된 PBS buffer와 bile salt (Sigma, MO, USA)를 0%, 0.3%, 0.5% 첨가한 MRS 액체배지에 유산균을 1% (v/v) 접종하여 배양한 이후 각각 0-3시간 및 0-6시간 생균수를 측정하여 생존율을 산출하였다. 식물 유래 유산균으로 알려진 LP을 대조균으로 이용하였으며 동일한 조건에서 3반복 실험을 진행하였으며 생존율은 다음의 식에 의하여 산출하였다.

$$\text{Survival rate (\%)} = (\text{Log CFU} \div \text{Log CFU}_{\text{initial}}) \times 100$$

분리한 유산균의 용혈성은 5% sheep blood (MBcell, Seoul, Korea)를 첨가한 MRS 평판배지를 사용하여 확인하였다. 분리한 유산균을 희선평판법으로 도말하여 37°C에서 48-72 시간 동안 배양하면서 용혈현상으로 인해 균주 주변에 형성되는 환의 형태를 관찰하여 용혈성 여부를 판단하였다.

항생제 감수성 시험

항생제에 대한 감수성은 agar-disc diffusion 방법으로 13종에 해당하는 항생제를 함유한 antibiotic-disc (Liofilchem, Antibiotic disc, Italy): amikacin (AK, 30 µg), ampicillin (AMP, 10 µg), cephalothin (KF, 30 µg), penicillin (P, 10 IU), chloramphenicol (CI, 30 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), erythromycin (E, 15 µg), gentamicin (CN, 10 µg), kanamycin

(K, 30 µg), streptomycin (S, 10 µg), tetracycline (TE, 30 µg), sulfamethoxazole with trimethoprim (SXT, 25 µg), vancomycin (VA, 30 µg)을 사용하였다. 분리한 유산균을 MRS 액체배지를 이용하여 37°C에서 24시간 배양한 후 10⁶ CFU/mL가 되도록 희석하여 MRS 평판배지에 도말한 다음, 그 위에 antibiotic-disc를 올려놓고 37°C에서 24시간 배양 후 각 항생제에 대한 저해환의 크기를 vernier caliper (CD-15APX, Mitutoyo Co., Kanazawa, Japan)로 측정하여 항생제에 대한 감수성을 판단하였다. 식물 유래 유산균으로서 대조군 LP를 이용하여 동일한 방법으로 3반복 실험을 진행하였다.

항균활성 확인

식중독을 유발하는 위해미생물로 알려진 *B. cereus* (KCTC 1013), *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895), *S. typhimurium* (KCTC 2515), *S. aureus* (KCTC 1621), *L. monocytogenes* (KCTC 3569), 5종에 대한 항균활성은 paper-disc method를 이용하였다. 분리한 유산균을 MRS 액체배지를 이용하여 37°C에서 24 및 48시간 배양한 후 원심분리하여 제조한 상등액을 순수한 상등액(Pure-supernatant: PS) 시료로 사용하였으며 PS를 95°C에서 5분간 증탕처리한 상등액(Heat-treated supernatant: HS), PS의 pH를 7.0±0.3으로 중화처리한 상등액(Neutralized-supernatant: NS), NS를 95°C에서 5분간 증탕처리한 상등액(Neutralized & heat-treated supernatant: TS)을 제조하여 항균활성을 조사하였다. 5종의 위해미생물은 nutrient (BD Difco™) 액체배지를 이용하여 30°C에서 24시간 배양한 후 *B. cereus* (10³ CFU/mL), *E. coli* O157:H7 (10⁵ CFU/mL), 그리고 *S. typhimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* (10⁶ CFU/mL)를 준비하여 nutrient 평판배지에 도말한 후 8 mm 직경의 paper-disc (Advantec, Tokyo, Japan)를 위치하고 각각의 시료를 60 µL씩 분주하여 30°C에서 12 및 24시간 배양 후, 위해미생물의 생육 저해환의 크기를 vernier caliper로 측정하였다. 식물 유래 유산균으로서 대조군인 LP를 이용하여 동일한 방법으로 3반복 실험을 진행하였다.

소수성(Hydrophobicity) 및 Aggregation

탄화수소에 대한 세포 표면 소수성(BATH, bacterial adhesion to hydrocarbon)과 aggregation 실험은 기존 방법(Collado et al., 2008)을 약간 변형하여 적용하였다. 분리한 유산균과 대조군인 LP는 MRS 액체배지를 이용하여 37°C에서 24시간 배양한 후 원심분리하여 회수한 균체를 PBS 용액으로 세척하고 UV-Visible spectrophotometer (Optizen POP, Mecasys Co., Daejeon, Korea)를 이용하여 600 nm에서 OD (Optical density)를 0.6으로 조정된 현탁액을 준비하였다. 준비한 현탁액(A0)을 chloroform 및 xylene (Sigma, MO, USA)과 각각 1:1 비율로 혼합한 다음 vortex mixer

를 이용하여 약 30초간 균질화시키고 상온에서 30, 60, 120분 동안 정지배양한 이후 수용액층(A)을 분리하였다. 초기 현탁액(A0)과 분리한 수용액층(A)을 600 nm에서 OD를 측정하여 다음의 계산식에 따라 용매에 대한 세포 표면에 대한 소수성을 산출하였다. 대조군인 LP를 이용하여 동일한 방법으로 3반복 실험을 진행하였다.

$$\text{Hydrophobicity (\%)} = [1 - (A \div A0)] \times 100$$

장내 부착능력을 간접적으로 확인하기 위한 auto-aggregation과 co-aggregation 실험은 기존 방법(Collado et al., 2008)을 약간 변형하여 진행하였다. 분리한 유산균과 대조군인 LP는 MRS 액체배지를 이용하여 37°C에서 24시간 배양한 후 원심분리하여 회수한 균체를 PBS 용액으로 세척하고 spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 OD가 1.0이 되도록 조정된 현탁액을 준비하였다. 준비한 현탁액(B0)을 4 mL 취하여 10초간 진탕한 뒤 1.5-24시간 상온에 방치한 후 상등액(B)의 OD를 측정하여 다음 계산식에 따라 auto-aggregation을 산출하였다. 대조군인 LP를 이용하여 동일한 방법으로 3반복 실험을 진행하였다.

$$\text{Auto-aggregation (\%)} = [1 - (B \div B0)] \times 100$$

또한 식중독을 유발하는 5종의 위해미생물은 nutrient 액체배지를 이용하여 37°C에서 24시간 배양한 후 원심분리하여 회수한 균체를 PBS 용액으로 세척하고 spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 OD가 1.0이 되도록 조정된 현탁액을 준비하였다. auto-aggregation 실험과 동일한 방법으로 준비한 유산균과 위해미생물의 현탁액을 총 4 mL이 되도록 1:1로 혼합하고 30초간 진탕한 뒤 실험 시작 직후의 상등액(C0)과 진탕 후 1.5-24시간 동안 상온에서 방치한 상등액(C)의 OD를 측정하여 다음 계산식에 따라 co-aggregation을 계산하였다.

$$\text{Co-aggregation (\%)} = [1 - (C \div C0)] \times 100$$

통계분석

실험결과는 최소한 3 반복 이상으로 진행되었으며 실험 결과는 평균과 표준편차로 처리하였다. 통계처리는 statistical package for the social sciences (SPSS ver. 23.0, IBM SPSS, Armonk, NY, USA)를 이용하였으며 각 평균값의 유의성 차이는 ANOVA, Duncan's multiple range test로 사후 검정을 실시하여, $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

유산균의 분리 및 동정

전통 발효식초에서 분리한 유산균은 Gram 양성인 간균

Table 1. Biochemical characteristics of *Lactobacillus harbinensis* VF isolated from fermented vinegar and related strains

Classification	KACC 92345P	DSM 16991	SBT 10904	KACC 12409	K.V 9.3.1Np	AB 196123
Glycerol	-	+	+	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-
D-arabinose	-	+	+	w	-	w
L-arabinose	+	+	+	+	+	+
D-ribose	-	-	-	-	-	-
D-xylose	+	-	+	+	-	+
L-xylose	-	-	-	-	-	-
D-lyxose	-	-	-	-	-	-
D-adonitol	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-
Methyl-β-D-xylopyranoside	-	-	+	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	w	+	+	w	-	w
D-Fucose	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	+	w	-	w
Dulcitol	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-
D-mannitol	+	-	-	-	-	-
D-sorbitol	w	-	-	-	-	-
Amygdalin	+	+	+	+	+	+
Arbutin	+	+	+	+	+	+
Esculin	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+
α-Methyl-D-mannopyranoside	-	-	-	-	-	-
α-Methyl-D-glucopyranoside	+	+	+	+	-	+
N-acetyl-glucosamine	+	+	+	+	+	+
Gluconate	w	w	w	+	+	+
2-Keto-gluconate	-	w	w	-	-	-
5-Keto-gluconate	-	+	+	-	-	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
D-lactose	+	+	+	-	+	-
Melibiose	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+
Gentiobiose	w	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+
D-Turanose	+	+	+	w	-	w
Melezitose	+	+	+	+	-	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+
Starch	-	-	+	w	-	w
Inulin	w	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-
Growth at 10°C (MRS broth)	-	-	-	+	-	+
Growth at 15°C	-	+	+			
Growth at 20°C	+	+	+		+	
Growth at 45°C	-	-	-	-	-	-
Growth at pH 3 (MRS broth)	+			+		+
Growth at pH 4-8	+			+		+
Salt tolerance at 3% NaCl	+			+		+

의 형태를 지니고 있으며 API Kit를 이용하여 확인된 균종은 *Lactobacillus brevis*이지만 유의성은 90.7% 수준으로 낮았다. 분리한 유산균은 16S rRNA 염기서열 분석에 따라 *L. harbinensis* DSM 16991와 99.9% 일치하는 것으로 확인되어 *L. harbinensis*로 최종 확인되었다. 기존에 보고된 *L. harbinensis*의 생리적 특성과 생화학적 특성을 비교한 결과(Table 1), 16S rRNA 염기서열에서 99.9% 일치한 DSM 16991 (Miyamoto et al., 2005)과는 glycerol, D-arabinose, D-xylose, D-mannitol, D-sorbitol, 5-keto-gluconate, inulin에 대한 이용능이 다른 것으로 확인되었다. 또한 *L. harbinensis*로 보고된 DSM 16991 이외에 4종, SBT 10904 (Miyamoto et al., 2005), KACC12409 (Wu et al., 2014b), K.V9.3.1Np (Delavenne et al., 2013), AB 196123 (Wu et al., 2014a)의 생화학적 특성을 비교한 결과, 본 연구에서 분리한 *L. harbinensis*는 D-mannitol과 D-sorbitol에 대한 이용능이 다른 것으로 확인되어 *Lactobacillus harbinensis* VF (LH)로 명명하고 국립농업과학원 씨앗은행에 기탁하였다(KACC 92345P).

Acid tolerance(내산성)

유산균이 프로바이오틱스로서의 효과를 나타내기 위해서는 소화액과 유사한 낮은 pH와 담즙산에서 생존할 수 있는 조건을 충족하여야 한다고 알려져 있다. 분리한 유산균인 LH와 대조균인 LP를 대상으로 pH에 대한 내성을 조사한 결과를 Table 2에 정리하였다. 대조균인 LP는 pH 2.5 이하에서 노출되는 시간이 증가함에 따라 생존율이 낮아졌으며 pH 2.0과 2.5에서 3시간 노출에 의하여 각각 18.1% 및 65.4%로 낮은 생존율이 확인되었다. 그러나 pH 3.0 이상에서는 3시간 노출되어도 95% 이상이 생존하는 것으로 확인되었다. 유제품에서 분리한 *L. plantarum* MLE5는 pH 2.0에 노출된 경우에 한하여 생존율이 감소하는 것으로 보고되었으며(Colombo et al., 2018) 이러한 현상은 전통 피클에서 분리한 *L. plantarum* 균주들의 경우에도 pH 2.5에서 4시간 노출된 이후 생존률이 0-85%로 개별 균

주의 특성에 기인하다고 판단되었다(Tokatlı et al., 2015). 말레이시아의 Kefir 샘플에서 분리한 *L. plantarum* (D/J)은 pH 2에서는 생존하지 못하였지만 pH 3과 4에서는 각각 85% 및 92% 이상의 생존율이 보이고 있는 반면(Talib et al., 2019) 루마니아의 Braga (BR9)와 water Kefir (CR1)에서 분리된 *L. plantarum*의 경우에는 pH 2.5에서 1시간 노출되었어도 생존율이 91-100%로 보고되었다(Angelescu et al., 2019). 본 연구에서 분리한 LH는 전통 발효식초에서 분리하여 기본적으로 낮은 pH에 대한 내성이 높을 것으로 예측되었으며 pH 2.0에서 3시간 노출되었을 때 생존율이 68.9%이었으며 pH 2.5 이상에서는 95.6% 이상의 높은 생존율이 확인되었다. 루마니아의 water Kefir grain (CR12)에서 분리된 *L. harbinensis*는 pH 2.5에서 1시간 노출된 경우 생존율이 40% 내외로 보고되었고(Angelescu et al., 2019) 말레이시아의 Kefir 샘플에서 분리된 *L. harbinensis* (A)는 pH 2에서는 생존하지 못하였지만 pH 3과 4에서 각각 64% 및 92% 내외의 생존율이 보고되었다(Talib et al., 2019). 중국의 전통 두부에서 분리한 *L. harbinensis* M1은 pH 3에서 3시간 노출된 이후 생존율이 30% 수준으로 감소한 것으로 보고되었다(Zheng et al., 2020). 이처럼 유산균의 내산성은 개별 균주의 특성으로 판단되지만 본 연구에서 분리한 LH는 기존에 알려진 *L. harbinensis*에 비하여 내산성이 우수한 것으로 확인되었다.

Bile salt tolerance(내담즙성)

분리한 유산균인 LH와 대조균인 LP는 담즙산의 농도와 노출시간이 증가함에 따라 생존율이 감소하는 경향이 확인되었으며 LH와 LP는 0.5% 담즙산에서 6시간 노출된 이후 생존율이 각각 58.8%와 74.2%로 확인되었다(Table 3). LH의 담즙산에 대한 내성은 0.3% 담즙산에서 노출시간이 증가함에 따라 대조균로 사용된 LP보다 생존율이 낮아지는 반면 0.5% 담즙산에서는 LP보다 높은 생존율을 보이고 있었다. 이러한 현상은 전통적인 피클시료에서 분리한 *L. plantarum*는 0.3% Bile salt에서 4시간 노출된 이후 생존율

Table 2. Survival rate of *L. harbinensis* VF (LH) and *L. plantarum* (LP) under acidic condition from 1 to 3 h in PBS buffer

Strain	pH	log CFU/mL at incubation time			
		0 h	1 h	2 h	3 h
LP	2.0	9.35±0.05 ^d	4.07±0.03 ^c	2.29±0.12 ^b	1.69±0.09 ^a
	2.5	9.38±0.05 ^d	8.90±0.03 ^c	7.13±0.10 ^b	6.13±0.03 ^b
	3.0	9.39±0.03 ^d	9.22±0.03 ^c	9.13±0.03 ^b	8.99±0.01 ^a
	4.0	9.38±0.07 ^b	9.31±0.01 ^b	9.18±0.01 ^a	9.12±0.02 ^a
	6.5	9.39±0.02 ^b	9.33±0.03 ^b	9.21±0.02 ^a	9.22±0.06 ^a
LH	2.0	9.26±0.02 ^d	8.38±0.17 ^c	7.54±0.04 ^b	6.38±0.01 ^a
	2.5	9.23±0.09 ^b	9.29±0.28 ^b	9.18±0.05 ^b	8.82±0.08 ^a
	3.0	9.29±0.04 ^c	9.24±0.01 ^{bc}	9.19±0.02 ^{ab}	9.14±0.03 ^a
	4.0	9.31±0.05	9.29±0.03	9.23±0.03	9.23±0.01
	6.5	9.32±0.01 ^b	9.30±0.02 ^a	9.19±0.04 ^b	9.26±0.03 ^b

Table 3. Survival rate of *L. harbinensis* VF (LH) and *L. plantarum* (LP) in MRS medium containing 0.3 & 0.5% bile salt from 1 to 6 h in MRS broth

Strain	Bile salt	log CFU/mL at incubation time				
		0 h	1.5 h	3 h	4.5 h	6 h
LP	0.0%	9.31±0.02 ^b	9.40±0.05 ^b	9.29±0.03 ^b	9.31±0.03 ^b	9.31±0.02 ^a
	0.3%	9.31±0.02 ^d	9.23±0.04 ^d	8.93±0.02 ^c	8.70±0.03 ^b	8.24±0.10 ^e
	0.5%	9.31±0.02 ^e	8.78±0.04 ^d	7.64±0.02 ^c	6.27±0.07 ^b	5.45±0.11 ^a
LH	0.0%	9.25±0.02 ^d	9.33±0.04 ^e	9.45±0.03 ^b	9.55±0.03 ^a	9.56±0.03 ^a
	0.3%	9.25±0.02 ^e	9.11±0.03 ^d	8.49±0.01 ^c	7.90±0.03 ^b	7.24±0.04 ^a
	0.5%	9.25±0.02 ^e	8.76±0.06 ^d	7.73±0.08 ^c	7.44±0.08 ^b	6.86±0.07 ^a

이 45-99%로 보고된 반면(Tokatlı et al., 2015) 말레이시아의 Kefir 샘플에서 분리된 *L. plantarum* (D/I)는 0.3% 및 0.5% 담즙산에서 3시간 노출된 이후 각각 73% 및 85% 내외의 유사한 생존율이 보고되었다(Talib et al., 2019). 또한 루마니아의 Braga (BR9)와 water Kefir (CR1)에서 분리된 *L. plantarum*은 0.8% 및 2.0% 담즙산에 3시간 노출된 이후 생존율이 61-66%로 보고되었다(Angelescu et al., 2019). 루마니아의 water Kefir grain에서 분리된 *L. harbinensis* (CR12)는 0.8% 및 2.0% 담즙산에 3시간 노출된 이후 생존율이 각각 49% 및 45%로 보고되었다(Angelescu et al., 2019). 말레이시아의 Kefir 샘플에서 분리된 *L. harbinensis* (A)는 0.3% 및 0.5% 담즙산에서 3시간 노출된 이후 70% 수준의 생존율을 보이고 있었다(Talib et al., 2019). 한편 유제품에서 분리된 *L. harbinensis* MSI3과 MSI4는 0.5% 담즙산에서 4시간 노출된 경우에 생존율이 다소 감소하는 반면 3.0% 담즙산에서는 별다른 차이가 없는 것으로 보고되었다(Colombo et al., 2018). 본 연구에서 분리된 LH는 0.3% 및 0.5% 담즙산에서 3시간 노출된 이후 생존율이 91.8% 및 83.6% 수준이었으며 6시간 노출된 경우에도 78.2% 및 74.2% 수준의 생존율이 확인되어 기존에 알려진 *L. harbinensis*에 비하여 담즙산에 대한 내성도 우수한 것

으로 확인되었다.

Hemolysis(용혈성)

용혈성은 5% sheep blood를 첨가한 MRS 평판배지를 이용하여 분리한 LH와 대조구인 LP에 대하여 최대 72시간까지 관찰한 결과, 모두 γ -hemolysis로 확인되어 용혈성에 대한 안전성이 확보되었다.

Antibiotic resistance(항생제 내성)

일반적으로 *Lactobacillus*는 다양한 항생제에 대한 내성을 지니고 있는 것으로 알려져 있기 때문에(Danielsen & Wind, 2003) 분리한 LH와 대조구인 LP에 대하여 13종의 항생물질에 대한 감수성을 조사하였다(Table 4). LP는 ciprofloxacin, kanamycin, streptomycin, vancomycin에 대한 내성이 없었으며 amikacin과 gentamicin에 대한 감수성은 높은 것으로 확인되었다. 반면 LH는 유일하게 sulfamethoxazole과 trimethoprim이 혼합된 항생물질에 대한 내성이 없는 것으로 확인되었으며 amikacin, gentamicin, kanamycin, vancomycin에 대한 감수성이 높은 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 말레이시아 Kefir 시료에서 분리된 *L. harbinensis*와 *L. plantarum*이 ampicillin, tetracycline,

Table 4. Antibiotic susceptibility of *L. harbinensis* VF (LH) and *L. plantarum* (LP)

Antibiotics	D±SD (mm)	
	LH	LP
AK (Amikacin)	5.29±0.41 ^c	2.51±0.13 ^a
AMP (Ampicillin)	41.8±0.44 ^j	35.0±1.14 ^h
KF (Cephalothin)	23.8±0.52 ^f	20.7±0.39 ^e
P (Penicillin)	37.5±0.96 ⁱ	24.8±1.16 ^g
CI (Chloramphenicol)	31.9±0.47 ^g	23.9±0.36 ^f
CIP (Ciprofloxacin)	23.4±0.30 ^f	-
E (Erythromycin)	32.4±0.77 ^g	25.3±0.29 ^g
CN (Gentamicin)	3.35±0.23 ^a	4.42±0.16 ^b
K (Kanamycin)	6.35±0.29 ^d	-
S (Streptomycin)	11.4±0.24 ^e	-
TE (Tetracycline)	36.1±1.14 ^h	13.4±0.26 ^d
SXT (Sulfamethoxazole with Trimethoprim)	-	10.6±0.27 ^c
VA (Vancomycin)	2.43±0.73 ^a	-

penicillin에 대한 내성이 높은 것으로 보고된 결과와 일치하였다(Talib et al., 2019). 그러나 발효두유에서 분리된 *L. harbinensis* M1는 vancomycin에 대한 내성이 없었으며 kanamycin과 streptomycin에 대한 감수성이 낮은 반면 gentamycin, tetracycline, chloramphenicol, ampicillin, erythromycin에 대한 높은 감수성과는 다른 경향을 보이고 있다(Zheng et al., 2020). 발효 요거트에서 보고된 *L. harbinensis*는 vancomycin, streptomycin, kanamycin, trimethoprim/sulfamethoxazole에 대한 감수성이 낮은 반면 erythromycin, tetracycline, ampicillin, chloramphenicol에 대한 감수성이 예민한 것으로 보고되어 본 연구결과와 반대되는 경향을 보이고 있다(Delavenne et al., 2013). 김치에서 분리한 *L. plantarum*과 *L. sake*는 gentamycin과 streptomycin에 대한 감수성이 낮은 반면 erythromycin과 penicillin에 대한 감수성은 예민한 것으로 보고되기도 하였다(Lee et al., 2011). *Lactobacillus* species가 지닌 항생제에 대한 내성이나 감수성은 개별 균주의 특성으로 이해되며 본 연구에서 분리한 LH는 기존에 알려진 *L. harbinensis*에 비하여 항생물질에 대한 광범위한 내성을 지니고 있는 것으로 확인되었다.

Antimicrobial activity(항균활성)

분리한 유산균(LH)과 대조균(LP)을 MRS 액체배지에서 24 및 48시간 배양한 후 원심분리하여 균체를 제거한 상등액(PS), pH를 중성처리(NS)하거나 가열처리(HS), 그리고 중화 및 가열처리(TS)한 시료를 이용하여 식중독을 야기하는 위해미생물 5종에 대한 항균활성을 측정된 결과, PS에서만 *S. aureus*를 제외한 4종의 위해미생물에 대한 항균활성이 확인되었다(Table 5). 항균활성 측정에 사용된 PS 용액의 pH는 3.6-3.8으로 유산균의 생육에 따라 생성되는 유기산에 의한 항균활성으로 판단되었다. 이러한 결과는 우유를 이용한 요거트 발효에서 스타터와 함께 *L. harbinensis* K.V9.3.1Np를 이용하여 젓산과 더불어 생성되는 유기산에 의하여 항곰팡이 활성을 높이는 방법을 제시한 연구결과와 유사하였다(Delavenne et al., 2013). 또한 *L. harbinensis* M1

의 PS에서 *S. typhimurium*, *E. coli* O-157, *L. monocytogenes*에 대한 항균활성이 확인되었으나 *S. aureus*에서는 항균활성이 확인되지 않는다는 결과와 일치하였다(Zheng et al., 2020). 한편 발효음료에서 분리한 *L. harbinensis* CR12는 *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*에 대한 항균활성이 본 연구결과와 일치하였지만 *S. aureus*에 대한 항균활성은 다른 결과를 보이고 있었다(Angelescu et al., 2019). 김치에서 분리한 *L. plantarum*과 *L. sake*는 *E. coli*와 *S. typhimurium*에 대한 항균활성이 없는 반면 *L. monocytogenes*와 *B. cereus*에서는 항균활성이 있는 것으로 보고되기도 하였다(Lee et al., 2011). 본 연구에서 선발한 *L. harbinensis* VF의 항균활성은 생육에 따라 생성되는 다양한 유기산(낮은 pH)에 기인하는 것으로 확인되었다.

Cell surface hydrophobicity(소수성)

세포의 장내 부착성은 세포 표면의 조성과 구조에 의한 영향을 받고 있으며 세포표면의 소수성과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다(Tulumoglu et al., 2013). 프로바이오틱스로 사용되는 유산균은 장내 부착성이 요구되기 때문에 상대적으로 높은 cell surface hydrophobicity와 aggregation 능력이 좋은 것으로 알려져 있다(Li & So, 2021). 또한 탄화수소(용매)에 대한 세포 표면 소수성은 세포막과 표면에서의 다양한 반응에 의한 결과이며 이러한 현상은 동일 균주 또는 유전적으로 다른 균주와의 aggregation에 영향을 미친다고 알려져 있다(Collado et al., 2008). Cell surface hydrophobicity를 xylene과 chloroform을 이용하여 측정된 결과, 분리한 LH는 대조구인 LP에 비하여 hydrophilic한 것으로 확인되었다(Table 6). 프로바이오틱스로 알려진 *Lactobacillus* 7종에 대하여 xylene을 이용하여 측정된 hydrophobicity는 13.5-67.1%이었으며 이 중 *L. plantarum* Lp-115는 44.2%로 보고되어 이번 결과와 유사하였다(Collado et al., 2008). *Lactobacillus* 20종에 대하여 xylene을 이용하여 보고된 hydrophobicity는 *L. casei* 94 (16.9%), *L. plantarum* 130 (26.7%), *L. casei* 196 (35.8%), *L. plantarum* fl2 (45.5%)를 제외하면 대부분 62.6% 이상으로

Table 5. Antimicrobial activities of *L. harbinensis* VF (LH) and *L. plantarum* (LP) against pathogens

Strain	Culture time	Pathogen									
		<i>B. cereus</i> (10 ³)		<i>E. coli</i> (10 ⁵)		<i>S. typhimurium</i> (10 ⁶)		<i>S. aureus</i> (10 ⁶)		<i>L. monocytogenes</i> (10 ⁶)	
		12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
LH	24 h	+	+	+	+	++	+	-	-	++	++
	48 h	++	++	++	++	++	+	-	-	++	++
LP	24 h	-	-	+	+	++	+	-	-	+++	+++
	48 h	++	++	-	-	++	+	-	-	++	++

The degree of growth inhibition, expressed (-) represents inhibition zone < 8 mm with no clear halo, (+) represents inhibition zone between 8-12 mm, (++) represents inhibition zone between 12-16 mm, (+++) represents inhibition zone > 16 mm.

Table 6. Cell surface hydrophobicity of *L. harbinensis* VF (LH) and *L. plantarum* (LP) for xylene and chloroform at room temperature

Strain	Hydrocarbon	Hydrophobicity (%)		
		30 min	60 min	120 min
LP	Xylene	40.7±0.42 ^a	44.8±1.09 ^c	41.2±0.84 ^{bc}
	Chloroform	60.8±0.17 ^c	57.7±0.08 ^b	49.9±0.17 ^a
LH	Xylene	7.25±1.01 ^a	11.7±0.46 ^b	16.7±0.92 ^c
	Chloroform	6.61±0.92 ^a	14.4±0.64 ^b	20.4±0.73 ^c

보고되었으며(Tuo et al., 2013), *L. plantarum* 4종(KLB213, KLB234, KLB270, KLB296)에 대하여 chloroform을 이용하여 측정된 hydrophobicity는 각각 90.4%, 95.6%, 5.41%, 84.4%로 보고되었다(Li & So, 2021). 또한 *L. plantarum* (MLE5/MSI2)과 *L. harbinensis* (MSI3/MSIV2)에 대하여 xylene을 이용하여 확인된 hydrophobicity는 각각 97.2-99.5와 98.8-96.6%이었으며(Collado et al., 2008) 김치에서 분리한 12종의 *L. plantarum*과 *L. sake* 중에서 10종이 n-hexadecane을 이용한 hydrophobicity는 100%로 보고되었다(Lee et al., 2011). 탄화수소(유기용매)를 이용하여 측정되는 hydrophobicity는 동일한 *Lactobacillus* species라 하더라도 생육환경이나 유전적인 특성에 따른 개별 균주의 특성이며 세포표면의 이온반응 등 다른 영향도 있는 것으로 판단되었다.

Auto-aggregation & co-aggregation

분리한 LH와 대조구인 LP에 대한 auto-aggregation은 시간 경과에 따라 지속적으로 증가하여 24시간 이후에 각각 83.8%와 64.0%로 증가하였으며 5종의 식중독 유발 위해미생물과 co-aggregation 역시 각각 39.0-73.5% 및 49.2-87.6% 수준으로 확인되었다(Table 7). 위해미생물과 LH의 co-aggregation은 24시간 이후에 *B. cereus* (87.6%), *S. aureus* (74.1%), *L. monocytogenes* (70.5%), *E. coli* (67.6%), *S. typhimurium* (49.2%) 순이었으며 대조구인 LP보다 높은

경향이 확인되었다. 이러한 결과는 *L. plantarum* Lp-115의 auto-aggregation이 상온(20°C)에서 5.7%(2시간)에서 44.5%(24시간)로 시간경과에 따라 증가한다는 결과와 *S. aureus*에 대한 co-aggregation이 24시간 이후에 74.7%로 증가한다는 보고와 유사하였다(Collado et al., 2008). 그러나 *Lactobacillus* 20종에 대한 auto-aggregation은 37°C에서 5시간 이후에 24.2-41.4% 수준으로 보고된 결과보다는 높은 수준으로 확인되었다(Tuo et al., 2013). 또한 *L. harbinensis* (MSI3/MSIV2) (71.1-78.7%)가 *L. plantarum* (MLE5/MSI2) (86.9-91.7%) 보다 auto-aggregation이 다소 낮은 결과와는 차이가 있지만 *L. monocytogenes*와의 co-aggregation에서는 *L. harbinensis* (64.0-64.3%)가 *L. plantarum* (57.8-62.8%) 보다 다소 높은 결과와는 일치하였다(Colombo et al., 2018). 분리한 LH의 낮은 hydrophobicity로 인하여 auto-aggregation에서 낮은 결과가 예측되었지만 24시간 이후에는 LP와 유사한 수준이었으며 위해미생물과의 co-aggregation에서도 높은 수준을 확인하였다.

요 약

전통적인 발효식초로부터 산 생성능이 높은 유산균을 분리하여 생화학적 특성과 16S rRNA 염기서열 분석을 거쳐 신규의 *L. harbinensis* VF (KACC 92345P)를 분리·동정하였다. 본 연구에서는 분리된 *L. harbinensis* VF에 대하여

Table 7. Auto-aggregation of *L. harbinensis* VF (LH) and *L. plantarum* (LP) and co-aggregation between pathogens according to incubation time

Strain	Time	Auto-aggregation (%)	Co-aggregation (%)				
			<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
LP	1.5	8.54±0.93 ^a	14.3±1.60 ^a	4.85±0.34 ^a	3.09±1.21 ^a	6.87±0.67 ^a	5.53±0.58 ^b
	3.0	13.9±0.76 ^b	18.9±0.98 ^b	7.94±1.15 ^b	5.57±0.10 ^b	15.3±1.56 ^b	11.1±0.71 ^b
	5.0	18.2±0.65 ^c	26.0±0.88 ^c	9.96±0.37 ^c	7.36±0.61 ^c	23.5±2.04 ^c	15.8±0.45 ^c
	6.5	20.0±1.13 ^d	28.4±0.96 ^d	10.6±0.80 ^d	8.44±0.01 ^d	26.8±0.97 ^d	17.7±0.82 ^d
	24.0	64.0±0.09 ^e	71.3±0.05 ^e	53.6±0.05 ^e	39.0±0.20 ^e	73.5±0.05 ^e	62.6±0.06 ^e
LH	1.5	6.72±1.39 ^a	8.92±1.90 ^a	6.37±0.43 ^a	2.28±0.20 ^a	8.13±0.07 ^a	7.20±0.44 ^a
	3.0	9.44±0.57 ^b	11.1±0.44 ^b	9.89±1.22 ^b	4.04±1.06 ^b	15.4±0.86 ^b	11.0±0.66 ^b
	5.0	15.7±0.89 ^c	22.4±1.15 ^c	16.4±0.41 ^c	10.2±0.42 ^c	24.0±1.06 ^c	19.3±1.26 ^c
	6.5	17.5±0.35 ^d	25.6±1.03 ^d	12.5±0.33 ^d	9.90±1.31 ^c	26.9±1.69 ^d	21.8±1.03 ^d
	24.0	83.8±0.10 ^e	87.6±0.11 ^e	67.6±0.10 ^e	49.2±0.05 ^d	74.1±0.11 ^e	70.5±0.12 ^e

내산성, 내담즙성, 용혈성, 항생물질에 대한 내성, 항균활성, 소수성과 aggregation에 해당하는 프로바이오틱스 특성을 평가하였다. 분리된 *L. harbinensis* VF는 pH 2.0과 2.5에 3시간 노출되어도 생존율이 각각 68.9%와 95.6%이었으며 0.3% 및 0.5% 담즙산에서 3시간 노출되어도 생존율이 각각 91.8% 및 83.6%로 기준에 보고된 *L. harbinensis*에 비하여 높은 내산성과 내담즙성을 지니고 있었다. 또한 γ -hemolysis로 확인되어 용혈성에 대한 안전성도 확보되었다. 분리된 *L. harbinensis* VF는 trimethoprim/sulfamethoxazole를 제외한 12종의 항생물질에 대한 내성을 지니고 있으며 대조구로 사용한 *L. plantarum* (KCTC 3108)과 기준에 보고된 *L. harbinensis*보다 항생물질에 대하여 광범위한 내성을 지니고 있었다. 분리된 *L. harbinensis* VF는 *S. aureus*를 제외한 *B. cereus*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, 4종의 식중독 유발 위해미생물에 대한 항균활성이 확인되었으며 이러한 항균활성은 배양액에 존재하는 유기산에 기인하는 것으로 확인되었다. 분리된 *L. harbinensis* VF에 대하여 xylene과 chloroform을 이용하여 측정된 hydrophobicity는 1시간 반응한 이후 각각 11.7% 및 14.4%로 대조구인 *L. plantarum* (44.8% & 57.7%)에 비하여 낮은 소수성을 지니고 있었다. 분리된 *L. harbinensis* VF의 auto-aggregation 능력은 24시간 이후에 83.8%로 대조구인 *L. plantarum* (64.0%)보다 높았으며 위해미생물과의 co-aggregation은 *B. cereus* (87.6%), *S. aureus* (74.1%), *L. monocytogenes* (70.5%), *E. coli* (67.6%), *S. typhimurium* (49.2%) 순이었으며 대조구인 *L. plantarum*보다 높은 경향이 확인되었다. 본 연구결과로부터 발효식초로부터 분리한 *L. harbinensis* VF는 프로바이오틱스 균주로서 활용 가능성이 높을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2021학년도 원광대학교의 교비지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Angelescu IR, Zamfir M, Stancu MM, Grosu-Tudor S. 2019. Identification and probiotic properties of lactobacilli isolated from two different fermented beverages. *Ann. Microbiol.* 69: 1557-1565.
- Back W, Bohak I, Ehrmann M, Ludwig W, Pot B, Kersters K, Schleifer KH. 1999. *Lactobacillus perolens* sp. nov., a soft drink spoilage bacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* 22: 354-359.
- Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. 2008. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur. Food Res. Technol.* 226: 1065-1073.
- Colombo M, Castilho NPA, Todarov SD, Nero LA. 2018. Beneficial properties of lactic acid bacteria naturally present in dairy production. *BMC Microbiol.* 18: 219.
- Danielsen M, Wind A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 82: 1-11.
- Delavenne E, Cliquet S, Trunet C, Barbier G, Mounier J, Le Blay G. 2015. Characterization of the antifungal activity of *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np and *Lactobacillus rhamnosus* K.C8.3.II in yogurt. *Food Microbiol.* 45 (Pt A): 10-17.
- Delavenne E, Ismail R, Pawtowski A, Mounier J, Barbier G, Le Blay G. 2013. Assessment of lactobacilli strains as yogurt bio-protective cultures. *Food Control.* 30: 206-213.
- Fijan S. 2014. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 11: 4745-4767.
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. 2014. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11: 506-514.
- Jin J, Kim SY, Jin Q, Eom HJ, Han NS. 2008. Diversity analysis of lactic acid bacteria in takju, Korean rice wine. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 1678-1682.
- Kim EJ, Jo SW, Kim JK, Jeong DY. 2019. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated traditional fermented foods. *J. Life Sci.* 29: 697-704.
- Kim JH, Park LY, Lee SH. 2016. Seaweed fermentation and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Korean traditional foods. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 45: 1481-1487.
- Lacerda IC, Gomes FC, Borelli BM, Faria CL Jr, Franco GR, Mourão MM, Morais PB, Rosa CA. 2011. Identification of the bacterial community responsible for traditional fermentation during sour cassava starch, cachaça and Minas cheese production using culture-independent 16S rRNA gene sequence analysis. *Braz. J. Microbiol.* 42: 650-657.
- Laureys D, Vuyst LD. 2014. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water Kefir fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 2564-2572.
- Lee H, Yoon H, Ji Y, Kim H, Park H, Lee J, Shin H, Holzapfel W. 2011. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi. *Int. J. Food Microbiol.* 145: 155-161.
- Li SJ, So JS. 2021. In vitro characterization of cell surface properties of 14 vaginal *Lactobacillus* strains as potential probiotics. *Adv. Microbiol.* 11: 144-155.
- Miyamoto M, Seto Y, Hai HD, Teshima T, Bo SY, Kabuki T, Bing YL, Nakajima H. 2005. *Lactobacillus harbinensis* sp. nov., consisted of strains isolated from traditional fermented vegetables "Suan cai" in Harbin, Northeastern China and *Lactobacillus perolens* DSM 12745. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 688-694.
- Reid G, Jass J, Sebalsky MT, McCormick JK. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 658-72.
- Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N, Yolken RH. 2004. Longterm consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: Tolerance and safety. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 261-267.
- Sagdic O, Ozturk I, Yapar N, Yetim H. 2014. Diversity and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from gilaburu, a traditional Turkish fermented European cranberrybush (*Viburnum*

- opus* L.) fruit drink. Food Res. Int. 64: 537-545.
- Sekwati-Monang B, Valcheva R, Gänzle MG. 2012. Microbial ecology of sorghum sourdoughs: Effect of substrate supply and phenolic compounds on composition of fermentation microbiota. Int. J. Food Microbiol. 159: 240-246.
- Seo JH, Lee H. 2007. Characteristics and immunomodulating activity of lactic acid bacteria for the potential probiotics. Korean J. Food Sci. Technol. 39: 681-687.
- Seo JW, Yang HJ, Ryu MS, Jeong DY. 2020. Potential probiotic activity of *Lactobacillus brevis* SCML 504 isolated from traditional Korean fermented food and the preparation of 'Sikhye' with brown rice. Korean J. Food Preserv. 27: 46-57.
- Talib N, Mohamad NE, Yeap SK, Hussin Y, Aziz MNM, Masarudin MJ, Sharifuddin SA, Hui YW, Ho CL, Alitheen NB. 2019. Isolation and Characterization of *Lactobacillus* spp. from Kefir Samples in Malaysia. Molecules, 24: 2606.
- Tokatlı M, Gülgör G, Bağder Elmacı S, Arslankoz İşleyen N, Özçelik F. 2015. In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. Biomed. Res. Int. Article ID 315819.
- Tulumoglu S, Yuksekdogan ZN, Beyatli Y, Simek O, Cinar B, Yasar E. 2013. Probiotic properties of *Lactobacilli* species isolated from children's feces. Anaerobe, 24: 36-42.
- Tuo Y, Yu H, Ai L, Wu Z, Guo B, Chen W. 2013. Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. J. Dairy Sci. 96: 4252-4257.
- Vizoso Pinto MG, Franz CM, Schillinger U, Holzapfel WH. 2006. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. Int. J. Food Microbiol. 109: 205-214.
- Wu JJ, Du RP, Gao M, Sui YQ, Wang X. 2014a. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from tomato pomace. Ann. Microbiol. 64: 1849-1855.
- Wu JJ, Du RP, Gao M, Sui YQ, Xiu L, Wang X. 2014b. Naturally occurring lactic acid bacteria isolated from tomato pomace silage. Asian-Australas J. Anim. Sci. 27: 648-657.
- Zheng Y, Fei Y, Yang Y, Jin Z, Yu B, Li L. 2020. A potential flavor culture: *Lactobacillus harbinensis* M1 improves the organoleptic quality of fermented soymilk by high production of 2,3-butanedione and acetoin. Food Microbiol. 91: 103540.

Author Information

정지안: 원광대학교 식품생명공학과

유지영: 원광대학교 식품생명공학과

이성실: 원광대학교 일반대학원 경영학과

최준호: 원광대학교 식품생명공학과, 원광식품산업연구원